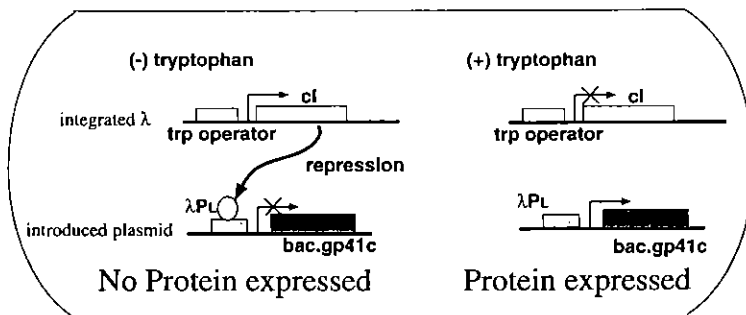


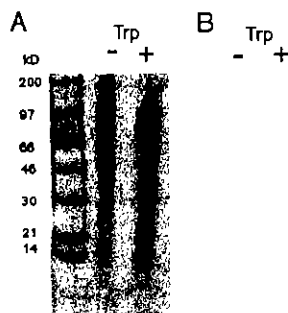
**Fig.1 The organization of the expression module**

To achieve high level of expression of the cytoplasmic portion of gp41 (gp41c) in bacteria, the codon usage of gp41c was optimized for bacteria using 10 synthetic oligonucleotides. A His-tag and chitin binding protein were attached at the N- and C-terminus of gp41c, respectively. The entire module was placed under the lambda PL promoter.



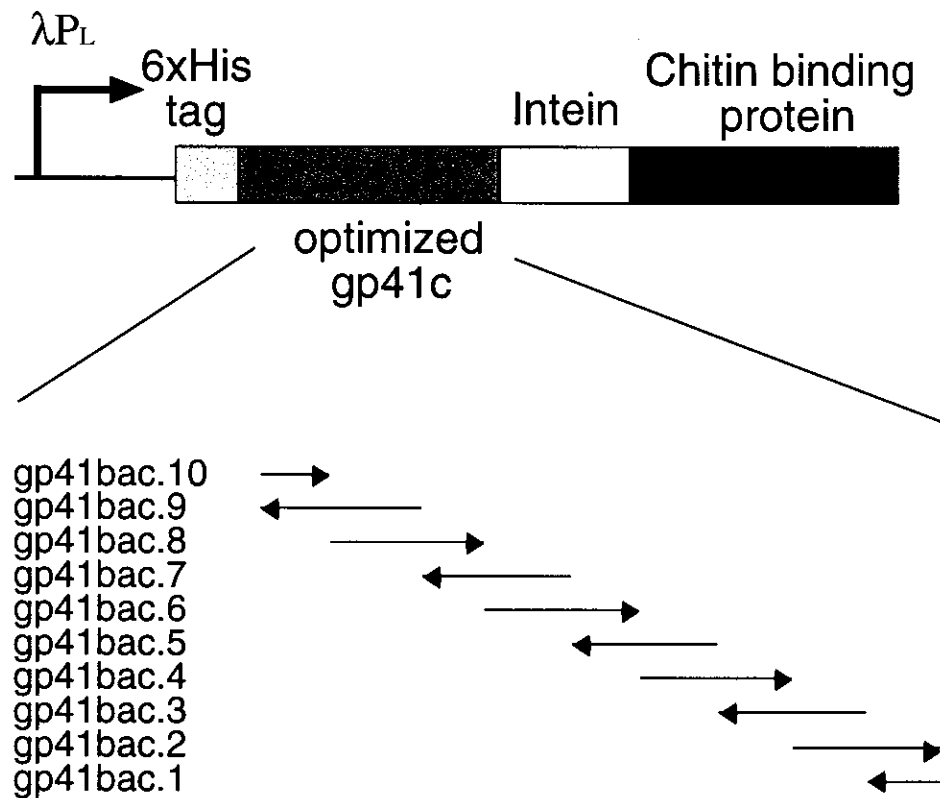
**Fig.2 The expression system using GI724**

The expression of gp41c is regulated by the lambda repressor which is under the control of the Trp operon. Under the presence of tryptophan in the medium, the expression of the lambda repressor is suppressed and in turn the expression of the gp41c protein is induced.



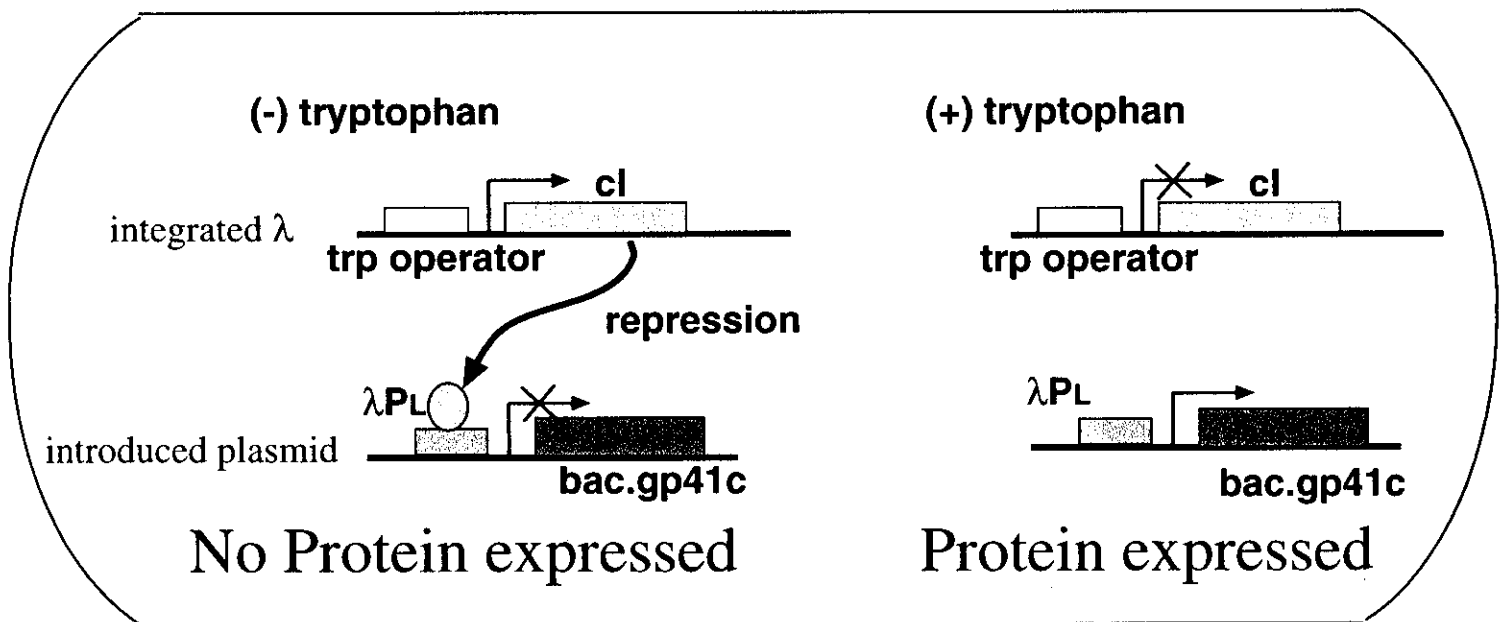
**Fig.3 Induction of gp41c in bacteria.**

Upon growth in a tryptophan containing medium, a protein of about 70kD was induced in GI724 (Trp+ lane). Coomassie stain of the gel (A) and an immunoblot analysis using the anti-His tag monoclonal antibody (B). (A) and (B) are derived from independent experiments.



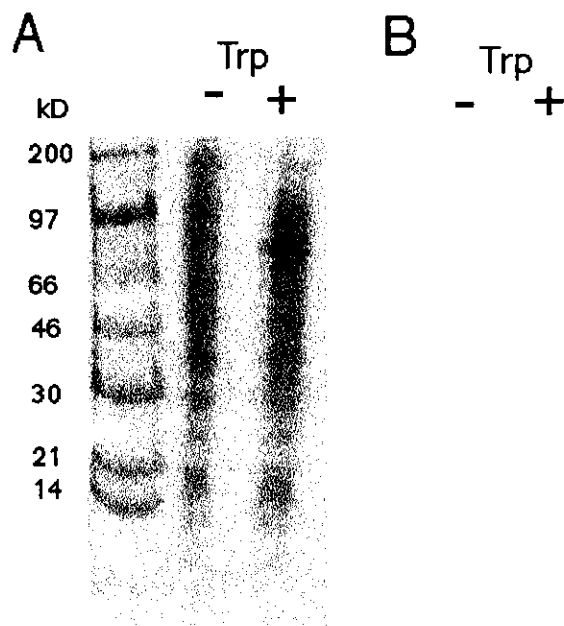
**Fig.1 The organization of the expression module**

To achieve high level of expression of the cytoplasmic portion of gp41 (gp41c) in bacteria, the codon usage of gp41c was optimized for bacteria using 10 synthetic oligonucleotides. A His-tag and chitin binding protein were attached at the N- and C-terminus of gp41c, respectively. The entire module was placed under the lambda PL promoter.



**Fig.2 The expression system using GI724**

The expression of gp41c is regulated by the lambda repressor which is under the control of the Trp operon. Under the presence of tryptophan in the medium, the expression of the lambda repressor is suppressed and in turn the expression of the gp41c protein is induced.



**Fig.3 Induction of gp41c in bacteria.**  
 Upon growth in a tryptophan containing medium, a protein of about 70kD was induced in GI724 (Trp+ lane). Coomassie stain of the gel (A) and an immunoblot analysis using the anti-His tag monoclonal antibody (B). (A) and (B) are derived from independent experiments.

## HIV修飾遺伝子産物の感染性ビリオン形成と感染性増強作用

分担研究者 小島 朝人 (国立感染症研究所感染病理部)  
共同研究者 倉田 毅 (国立感染症研究所感染病理部)  
足立 昭夫 (徳島大学医学部)

研究要旨：これまでの研究でHIV修飾蛋白のNefが、①ビリオンの細胞侵入過程を促進すること、②形成されるビリオンの細胞侵入効率をHIV産生細胞に依存して変化させること、を我々は明らかにしてきた。一方、NefはPxxPドメインやRRドメインを介して細胞性kinaseと相互作用を行うことが知られている。そこで、細胞性kinaseとの結合能を欠いたNef変異ウイルスを構築して、侵入効率の高いビリオンを形成するNef機能がkinaseとの相互作用を必要とするか検討した。その結果、PxxP変異、あるいはRR変異NefのHIVビリオンは野生型HIVと同等の細胞侵入効率を示すこと、PxxP変異ビリオンの感染性は逆転写の低下に由来するレベルにとどまることから、Nefによる高侵入効率ビリオンの形成作用は細胞性kinaseとは異なる経路を介していることが示された。

### A. 研究目的

HIVのNef作用は感染初期に発揮され、プロウイルスDNA合成が増加することから、逆転写効率を上昇させることが明らかにされている。一方、HIVの細胞侵入効率には影響しないとの報告が近年なされたが、我々は昨年度までの研究で、①Nefがウイルスの細胞侵入過程を促進すること、②この細胞内侵入効率化はビリオン産生細胞に依存すること、を明らかにした。他方、Nef作用にはPxxPやRRドメインを介した細胞性kinaseとの相互作用の必要性が報告されている。そこで本年度は、細胞性kinaseとの結合能を欠いたNef変異ウイルスを構築して、感染性ビリオン形成にNefを必要とする細胞において、細胞侵入効率の高いビリオンを形成するのにNefがkinaseとの相互作用を必要とするか否か検討した。

### B. 研究方法

HIVの調整：pNL432の野生型及びnef変異体 (frameshift mutant, point mutant)の感染性DNAクローン(20 $\mu$ g~200 $\mu$ g)を、付着性細胞株(293T, SW480, HeLa)にはリン酸カルシウム法で、T細胞株(CEMx174, M8166, H9, A3.01)にはDEAE-dextran法でトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞の培養上清から得られたウイ

ルス量をp24 ELISAで測定して、等量のビリオンを実験に使用した。ビリオンのエントリーアッセイ：CEMx174, M8166細胞を標的細胞として、一定量(20~200ng)のp24に相当するビリオンを一定数の細胞に吸着後、37°Cで1時間インキュベーションして細胞内へ侵入させた。未吸着ウイルスを洗浄し、非特異的に吸着しているビリオンをトリプシン処理で除去した後、1%NP-40で細胞を可溶化して、細胞内に侵入したビリオン量をp24ELISAで測定した。ウイルスの感染性測定：HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal (MAGI)細胞を用いたMAGIアッセイで定量した。即ち、37°Cで2時間ウイルスを感染させた後、2日間細胞を培養した。細胞を1%ホルマリン-0.2%グルタルアルデヒド混液で固定した後0.4mg/mlのX-Gal溶液で感染細胞を染色し、青色に染まるフォーカスの数をカウントして感染価を算出した。

### C. 研究結果

HIVの感染性増幅やプロウイルスDNAの合成にはNefとcellular kinaseとの相互作用が必要であると報告されている。そこで、本研究で見出したNefのウイルス産生細胞依存的なHIV細胞内侵入促進作用に、cellular kinaseとの相互作用が介在しているか検討を加えた。即ち、Src-family tyrosine kinaseであるHckのSH3ドメイ

ンへの結合に関与するNef蛋白72番と75番目のアミノ酸であるプロリンをアラニンに置換したNef変異DNAクローン(pNL-nAxxA)と、serine/threonine kinaseとの結合に関与するNef蛋白の105番と106番目のアルギニンをアラニンに置換したNef変異DNAクローン(pNL-nRR/AA)を、PCR-点変異導入法で新たに構築した。これらの感染性クローンを、高侵入性ビリオン形成にはNefを必要とするCEMx174細胞にトランスフェクトして、産生されてくるビリオンの細胞侵入効率をエントリーアッセイで検討した。その結果、nAxxA, nRR/AA Nef変異ビリオンとも細胞内侵入効率は野生型ビリオンと著明な変化を示さず、Nef欠損ビリオンのみが著しく低下していた。次に、感染性をMAGIアッセイで比較したところ、nAxxA Nef変異ウイルスは、Nef欠損ウイルスと同様、感染性の低下は認められるものの、その低下の程度は逆転写の低下のレベルにとどまっていた。この結果から、NefとHckの結合は、高細胞内侵入性の感染性ビリオン形成には関与せず、侵入後の逆転写の効率化に重要であることが示唆された。

#### D. 考察

HIVは僅か9種の遺伝子しか持たないにもかかわらず、複製・増殖を行ってエイズという重篤な疾病を引き起こす。このことは、細胞表面へのウイルスの吸着から始まって、細胞表面から子孫ウイルスを放出するに至るまでの種々のステップにおいて、各種の細胞因子をHIVは巧妙に利用していることを意味している。これまでの研究で、Nef機能については細胞性kinaseとの相互作用がすでに示されていた。本研究で明らかにされたビリオンの細胞内侵入促進作用という新たなNef機能には、細胞性kinase Hckとの結合ドメインを変異させたNef変異ウイルスでも野生型ウイルスと同等の細胞侵入効率を示すことから、Hckとは異なる別種の細胞性因子の関与が示唆された。現在のところその因子については不明であるが、細胞内侵入促進作用がウイルス産生細胞に特異的であることから、少なくとも2つの可能性が考えられよう。即ち、CEMx174細胞に存在して、HeLa, M8166, H9細胞などには存在しないか、存在量が少ないか、不

活性型として存在する抑制的因子；あるいは、HeLa細胞などに存在してCEMx174細胞には欠損している、Nefの有無に関係なくHIVの細胞内侵入にポジティブに作用する因子、の可能性である。いずれにせよ、侵入効率の高低がウイルス粒子の、どのような機能・どのビリオン蛋白に反映されているか解明することが必要であろう。そのような研究の進展が、HIV抑制のための新たな標的を明らかにして行くであろう。

#### E. 結論

HIVゲノムRNAの逆転写を促進するNef機能と密接に関連していることが知られているSrc-family kinaseとは異なった経路を介して、Nefはビリオン産生細胞依存的に細胞侵入効率の高いビリオン形成を促進し、HIVの感染性をポジティブに調節していることが明らかになった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yasuda, S., Iwasaki, M., Oka, S., Naganawa, S., Nakasone, T., Honda, M., Sata, T., Kojima, A., Matsuda, S., Takemori, T., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Detection of HIV-Gag p24-specific antibodies in sera and saliva of HIV-1-infected adults and in sera of infants born to HIV-1-infected mothers. *Microbiol. Immunol.*, 42, 305-311, 1998.
- 2) Tokunaga, K., Kiyokawa, E., Nakaya, M., Otsuka, N., Kojima, A., Kurata, T. and Matsuda, M.: Inhibition of human Immunodeficiency virus type 1 virion entry by dominant-negative Hck. *J. Virol.*, 72, 6257-6259, 1998.
- 3) Tokunaga, K., Kojima, A., Kurata, T., Ikuta, K., Akari, H., Koyama, H., Kawamura, M., Inubushi, R., Shimano, R. and Adachi, A.: Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by Nef is producer cell-dependent. *J. Gen. Virol.*, 78, 2447-2453, 1998.
- 4) Tokunaga, K., Kojima, A., Kurata, T., Ikuta, K., Inubushi, R., Shimano, R., Kawamura, M., Akari, H., Koyama, H. and

Adachi, A. : Producer cell-dependent requirement of the Nef protein for efficient entry of HIV-1 into cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 250, 565-568, 1998.

5) Tokunaga, K., Ikuta, K., Adachi, A., Matsuda, M., Kurata, T. and Kojima, A. : The cellular kinase binding motifs (PxxP and RR) in human immunodeficiency virus type 1 Nef protein are dispensable for producer cell-dependent enhancement of viral entry. *Virology* (in press).

## 2. 学会発表

- 1) Hoshikawa, N., Yoshihara, K., Yasuda, A., Kurata, T. & Kojima, A. : Vif:non-specific incorporation into Gag particles, and no influence on particle formation, processing and maturation. 12th World AIDS Conference Vol.1 Basic Science, pp19-23, Monduzzi Editore, 1998.
- 2) Yoshihara, K., Yasuda, A., Hoshikawa, N., Kurata, T., Chiba, J. & Kojima, A. : Antigenicity of chimeric HIV-like particles carrying repeats of an HCV core epitope. 12th World AIDS Conference Vol.1 Basic Science, pp283-287, Monduzzi Editore, 1998.
- 3) Yasuda, A., Moriishi, E., Kurata, T. & Kojima, A. : Antigenicity of HIV-1-like Gag-V3 chimeric particles expressed by a recombinant vaccinia system. 12th World AIDS Conference Vol.1 Basic Science, pp277-282, Monduzzi Editore, 1998.
- 4) 徳永研三、生田和良、足立昭夫、松田道行、倉田 毅、小島朝人 : ウイルス粒子のエントリーにおけるHIV-1Nefのウイルス産生細胞株依存的な要求性。第46回日本ウイルス学会総会、1998年10月、東京。
- 5) 寺尾圭一、大場浩美、曾我孝利、友澤尚徳、小島朝人、倉田 毅、千葉 丈 : HIVの逆転写酵素を阻害する組換え抗体断片によるCD4陽性ヒト培養細胞の細胞内免疫。第46回日本ウイルス学会総会、1998年10月、東京。
- 6) 吉原清美、安田幹司、北川善紀、干川就可、倉田 毅、千葉 丈、小島朝人 : 2種の異なる

エピトープを同一粒子中に集合させた複合HIV-1 Gagキメラ粒子の作製と抗原性解析。第46回日本ウイルス学会総会、1998年10月、東京。

7) 清川悦子、徳永研三、中矢実江、大塚尚美、倉田 毅、小島朝人、松田道行 : チロシンリン酸化酵素によるHIV粒子の感染効率の制御。第46回日本ウイルス学会総会、1998年10月、東京。

8) 小島朝人、吉原清美、安田幹司、千葉 丈、倉田 毅 : 異種エピトープを挿入したHIV-1Gag蛋白の自己集合による複合モザイク粒子抗原の構築と抗原性解析。第2回日本ワクチン学会総会、1998年11月、豊中。

9) Chiba, J., Ohba, H., Nakano, M., Soga, T., Terao, K., Yasuda, A., Kojima, A. and Kurata, T. : Generation of neutralizing antibodies to the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 by immunizing of mice with an infectious vaccinia virus recombinant. 第2回日本ワクチン学会総会、1998年11月、豊中。

# MAGIC-5 細胞株を用いた HIV-1 subtype E および subtype C 感染性クローンの樹立とその病原性解析

分担研究者 巽 正志 (国立感染症研究所獣医科学部)

研究要旨：MAGIC-5 細胞株による HIV-1 ウイルスクローニングと CD4 および CCR5 発現 HeLa 細胞に HIV-1 の LTR 下流に rev の核移行シグナルを付加した EGFP 遺伝子を組み込んだ細胞株 HeLa4.5/LTR-nEGFP による構築過程における Plasmid の感染性の検討により、Long PCR 法を用いた戦略で、感染者数が世界で激増している HIV-1 subtype C ウイルスの感染性クローンを樹立した。

## A. 研究目的

HIV-1 は gag, pol および env などの構成蛋白以外に様々な制御および修飾遺伝子を有する複雑な遺伝子構成の Lentivirus である。現在まで主に欧米に流行している subtype B の Molecular clones を用いてその病原性を担う遺伝子領域が検索されてきた。しかしながら HIV-1 subtype B は異性間の感染も認められるが主に homosexual および麻薬静注者などの risk group に侵淫していることが知られている。一方、最近の HIV-1 感染の epicenter は欧米から東南および南アジア地域に Shift しており、主に異性間性交渉で流行している HIV-1 は subtype E および subtype C が多くを占めている。本邦においても、近年異性間性交渉による subtype E の感染者数の増加の兆しが認められてる。Subtype 間における感染経路の違いによる感染効率の違いが認められるのにもかかわらず、subtype E および C の感染性クローンが得られていないため、その違いの由来する HIV-1 subtype 間の遺伝子構成の相違に基づく病原性の解析の進展における隘路になっており、早急に感染性クローンの樹立が求められている。

我々は先に HIV-1 の標的細胞への進入過程において必須なウイルスレセプター分子 CD4 と Coreceptor CXCR4 および CCR5 を発現し、感染した HIV-1 の tat の発現により  $\beta$ -galactosidase を発現する Indicator cell (MAGIC-5) を樹立し、患者血清からの臨床分離とウイルススクローニングに応用しうることを明らかにした。本研究はさらにこの方針を敷衍し、クローン化したウイルスを感染させた細胞ゲノムを鋳型に用いて、多くの HIV-1 で保存されている Primer binding site から 3' LTR までの 9.1Kbp に及ぶ Long PCR 法を用いて、効

率の良い感染性 Molecular clone の樹立を試みる。HIV-1 subtype E および subtype C の感染性クローンは subtype 間の病原性の異同の解析のみならず、ワクチン開発など様々な抗 HIV 戦略に新たな領域を開くものと期待される。

## B. 研究方法

HIV-1 subtype C として USA NIHAIDS Reagent & Reference Program からインド分離株 R5 である 93IN101 を入手し、先に樹立した HIV-1 の標的細胞への進入過程において必須なウイルスレセプター分子 CD4 と Coreceptor CXCR4 および CCR5 を発現し、感染した HIV-1 の tat の発現により  $\beta$ -galactosidase を発現する Indicator cell MAGIC-5 細胞に感染させ Agarose 重曹法によりウイルスを Cloning した後に、CD4 および CCR5 発現 HeLa 細胞 (HeLa 4.5) に感染させた。この感染細胞ゲノムを鋳型に、Los Alamos HIV Data Base より HIV-1 subtype C の Consensus 配列より Primer binding site (PBS) 領域と 3'-LTR 領域の候補 Primer を作製し Scanning して Long PCR 法により 9.0 Kbp の Amplicon が効率良く、特異的に増幅する Primer Pair を選定した。このほぼ全長に亘る Amplicon を安定に組み込む Plasmid Vector を pBR322 を基本骨格として構築した。5'-LTR から PBS までの小断片を挿入した Vector に、多くの HIV-1 で保存されている PBS 領域の Nar I site を用いて、3'-LTR 側の Not I site と共に制限酵素処理をした後組み込んで Prototype clone を構築した。この Plasmid を HeLa4.5. に LTR-nEGFP (EGFP 遺伝子下流に rev の核移行シグナルを付加した；国立感染症研究所エイズ研究センター 阪井博士から分与) を組み込み、HIV-1 に感染すると EGFP の



蛍光を発する細胞株 (HeLa4.5nEGFP) に Transfection し、その感染性を検討した。

### C. 研究結果

入手した HIV-1 subtype C 93IN101 を MAGI 細胞と MAGIC-5 細胞に感染させることにより Coreceptor usage を調べたところ、CCR5 を用いる R5 型 HIV-1 であった。先に報告した MAGIC-5 細胞を用いた Blue Plaque 法でウイルスを Cloning し、93IN.101.1~5 の 5 株を得た (図 1)。クローン化したウイルスを LTR-βGal 発現ユニットを組み込んでいない CD4/CCR5 発現 HeLa 細胞 (HeLa4.5) に感染させ、Syncytium 形成が認められた時点で、細胞 Genome を分離精製し、以後の PCR における鋳型として用いた。

感染性クローン構築の戦略として、PCR Recombination の生じる可能性を可及的に低めるため、5'LTR から Primer Binding Site (PBS) までの Short PCR と PBS から 3'LTR までの Long PCR でウイルス特異的な Fragment を増幅し、後に組み合わせる方針を立てた (図 2)。Los Alamos HIV Data Base より HIV-1 subtype C の Consensus 配列より Primer binding site (PBS) 領域と 3'-LTR 領域の候補 Primer を作製し、種々の Primer Pair で Long PCR を試行し Scanning して 9.0 Kbp に及ぶ Amplicon が効率良く、特異的に増幅する Primer Pair を選定した (図 3)。このほぼ全長に亘る Amplicon を安定に組み込む Plasmid Vector として当初は収量を考慮して High copy 数の pUC 系 Plasmid を用いて試行したが安定な Construct を構築することが困難であった。そこで Medium copy 数の pBR322 を基本骨格として、EcoR I および Ava I 切断後 Klenow fill in した部位に、pBluescript SK(+) から Pvu II で切り出せる Multi cloning site(MCS) を導入して pBR-KS を作製した。この MCS に 5'-LTR から PBS までの小断片を挿入した Vector に、多くの HIV-1 で保存されている PBS 領域の Nar I site を用いて、3'-LTR 側の Not I site と共に制限酵素処理をした後組み込んで Prototype clone p93IN101 を構築した。この Plasmid を HeLa4.5. に LTR-nEGFP を組み込み、HIV-1 に感染すると EGFP の蛍光を発する細胞株 (HeLa4.5nEGFP) に Transfection し、その感染性を検討したところ、蛍光を発したが、Syncytium 形成は認められなかった (図 4)。そこで PBS 領域の Primer を設計し直し改めて Plasmid

p93IN101.def を構築し、HeLa4.5nEGFP に Transfection しその感染性を検討したところ、蛍光を発し Syncytium 形成を認めた。その上澄は p24 gag が陽性であり、ウイルス粒子の形成が電子顕微鏡観察で認められたのにもかかわらず、感染性ウイルスの産生には至らなかった (図 4)。この p93IN101.def を Transfection することにより蛍光を発現することから、少なくとも tat は発現していることを意味する。さらに Syncytium 形成陽性であることから rev と env 遺伝子は機能していると考えられた。これらの成績から HIV-1 ゲノムの 5'半分のコード領域は少なくとも機能していることから、3'LTR, gag および pol 領域に欠損があるため感染性を獲得できないものと推測された。そこで同じ鋳型から 5'LTR から vpr まで HIV-1 ゲノム左半分を増幅し、種々の制限酵素にて p93IN101.def と共に切断後同じ切断片が生じるものをスクリーニングして選定した Nco I による切断片で再構築して Transfect したところ上澄中に感染性ウイルスが認められた (図 4)。この感染性クローンをインド分離株 HIV-1 subtype C の最初の感染性クローンであることから pIndle-C1 と命名した。

このクローンの Transfection 後上澄中のウイルスの Coreceptor usage を MAGI および MAGIC-5 細胞株への感染性で調べたところ、親ウイルスと同様に CCR5 を用いる R5 の Phenotype を示していた (図 5)。またその全塩基配列を鋭意決定の途上であるが、現在まで得られた配列の解析では、HIV-1 subtype C であることが確認された。

### D. 考察

本年度は世界で最初の HIV-1 subtype C の感染性クローンを樹立できた。WHO の統計と今後の感染者数の推移の予測によれば、最近の HIV-1 感染の epicenter は欧米から東南および南アジア地域に Shift しており、主に異性間性交渉で流行している HIV-1 は subtype E および subtype C が多くを占めていることが指摘されている。特に subtype C はインドおよびアフリカ諸国に感染集積を示し、今後とも激増することが予測されている。これらの地域において欧米でおこなわれている 3 剤併用療法などの対策はその費用の高さから現実的とは考えられない。そのため HIV-1 ワクチンの開発が喫緊の要として求められ、精力的に研究されているところである。HIV-1 のウイルス学的研究は、その社会的影響から多くの研究がなされ現在まで分離されたヒ

トに感染するウイルスの中でも特異的に進展が見られる領域であるが、特に感染性クローンの樹立により、ウイルスの分子生物学的解析が詳細を極めたことによることは周知のことである。しかしながら現在までその感染中心が欧米にあったため、その多くの感染性クローンは欧米で流行した subtype B に属するものであった。ワクチン開発等の基礎研究および subtype 間のウイルス学的研究のためには Reference となるべき感染性クローンがないことは、大きな隘路となっており、各国で感染性クローンの樹立のための努力がなされているところである。このような状況下で今回樹立された subtype C の感染性クローンは様々な HIV-1 研究領域における Reference Reagent となりうるものと期待される。

今回これまで Long PCR 法による感染性クローンの構築は確率が低いと考えられたのにも拘わらず、成功したのはいくつかの Key Point があるものと思われる。

第一に HIV-1 ウイルスを MAGIC-5 細胞による Blue Plaque 法により Cloning しており、Replication Competent で均一な集団のウイルスを濃縮していることがあげられる。現在、多くの試みでは PHA などで刺激した末梢血リンパ球 (PBMC) を標的細胞として、そのゲノムもしくは mRNA からの cDNA を鋳型に用いて Long PCR を行っている。しかしながら PBMC に感染して Provirus となったゲノムあるいは培養上澄のウイルス粒子のうち、その遺伝子構成に欠損があるものが少なからず存在することが知られている。また HIV-1 の特徴である quasispecies により感染 PBMC ゲノムあるいは培養上澄中のウイルス粒子そのものを PCR の鋳型にすることにより、PCR Recombination の起こる確率は高い。また PBMC そのものを標的細胞にすることは分離ウイルスの増殖が良好な Donor の選別が多く状況では必要になる。このことも分離ウイルスのひとつの Bias になりうる。さらに PBMC には CD8 T 細胞などの HIV-1 増殖を抑制する細胞群が存在することも考慮に入れるべきであろう。この点、MAGIC-5 細胞株によるウイルス分離と Cloning は、分離ウイルスに株化細胞に感染しえるウイルスのみが対象となる一種の Filter がかかるが、この問題点はどの培養系においても考えられる。われわれの現在までの経験では PBMC で分離したウイルスは例外なく MAGIC-5 で増殖したことから PBMC 分離より Spectrum が広い可能性もある。

第二に HIV-1 LTR の下流に rev の核移行シグナルを付加した EGFP を組み込んだ CD4/CCR5 発現 HeLa 細胞株 (HeLa4.5 nEGFP) で Construct の構築過程を Monitoring 出来る点である。構築した Construct が functional な tat, rev および env 遺伝子を発現しているか否か in situ に培養系にて解析しえる。今回の subtype C の再構築で示されたように EGFP 発現と Syncytium 形成の認められるにも拘わらず、感染性粒子の産生が認められない時は、Construct の 5'LTR から pol のいずれかの部位に欠損があることが推測され、その組換えを考えるのが有効な戦略となりうることを示された。この戦略も PCR の鋳型がクローン化したウイルスであるから mosaic clone を意図せず作製する危険性はないものと考えられる。現在のところ HIV-1 の感染性クローンの authentic な作製は感染性細胞からの Phage Library から全長を含んだ Phage clone を釣り上げてくることであることは異論はないが、この方法自体が大変手間がかかり確率の低い方法論であり、なにより良質な Library 構築のためには High copy 数の Provirus が組み込まれた感染細胞が得られることが第一段階で必須であるが、多くの HIV-1 分離株でこの条件が満たされるわけではない。さらに Hybridization 等で釣り上げた clone はあくまで塩基配列の相同性で選択したものであり、機能的に感染性が保証されたものではない。苦勞して釣り上げた Clone が最終的にいずれかの ORF が開いていないために Defective であることが数多く報告されている。また Library 構築の際に必要な情報として対象となるウイルスゲノムを切断しない制限酵素を検索しなければならない。

今回用いた MAGIC-5 細胞によるウイルスクローニングと Long PCR 法を併用した方法論 (図 6) は、対象ウイルスの LTR 領域の塩基配列が得られさえすれば、より迅速に感染性クローンが得られる確率が高いものと考えられた。PCR 法に内在する misincorporation による塩基置換の可能性については、近年の耐熱性 Polymerase の改良により Fidelity は向上してきており、近い将来さらにその品質がさらに良くなることが予測されることから、この戦略はさらに有効になるものと期待される。

先にわれわれは MAGIC-5 細胞で患者血清から直接ウイルスが分離できることを報告した。その後の臨床検体から分離経験を積み重ねることにより、当初樹立した MAGIC-5 細胞は継代を重ねると NL432 や BaL などの実験室株に対しては感受性が安定していたが、臨床検体からの分離効率が低下す

ることが認められた。Flowcytometryによる検索により、継代を重ねた MAGIC-5 細胞は CD4 分子の発現が低下していることが認められた。臨床分離株は実験室株に比較して、その感染に CD4 分子 density にたいする依存度が高いことが推測されたことから、改めて pEF-BOSpac に CD4 を組み込み CD4 の発現を高めた細胞株 MAGIC-5A を樹立した。この細胞株により  $10^4$  copy 以上の患者血清から、2~8 日間の培養でウイルスが分離可能であることが示され。分離ウイルスの V3 領域の塩基配列は MAGIC-5A で分離したウイルスのと相同であったことから、少なくとも MAGIC-5A によるウイルス分離に特別な Bias がかかっている可能性は低いものと考えられる。またこの細胞株は薬剤耐性ウイルス株の Phenotyping にも応用可能であることが示されていることから、この細胞株が HIV-1 研究の様々な領域に応用しえるものと考えられた。

現在東南アジアで猖獗を極め、近年本邦にも浸淫しつつありいまだ感染性クローンの得られていない HIV-1 subtype E に本戦略を適用してその早期の樹立を期している。

## E. 結論

MAGIC-5 細胞株によるウイルスクローニングと Long PCR 法により、世界に先駆けて HIV-1 subtype C の感染性クローンを樹立した。今後このクローンはワクチン開発および subtype 間の病原性の解析などの分子遺伝学的研究の Reference となりうるものと期待される。

## F. 研究発表

### 論文発表

Totsuka, K., Takakura, H., Hashimoto, O. and Tatsumi, M.; Molecular cloning and expression of cynomolgus monkey interleukin-1beta cDNA. *Int. Arch. Allergy Immun.* 116:40 - 48, 1998

### 学会発表

高橋礼典、巽 正志、高橋秀宗、倉田 毅; 異種細胞を用いた post-entry 過程における HIV-1 複製機構の解析 第 46 回日本ウイルス学会 10 月 12 日、東京  
横田恭子、加藤珠美、保田幸子、巽 正志、田村秀人、Yichen, L.; 樹状細胞を解した抗原刺激によって伝播活性化される SHIV の増殖能と病原性に関する解析 第 12 回日本エイズ学会 12 月 1 日、東京

## G. 図表説明

図 1) Blue Plaque Cloning Procedure of HIV-1; MAGIC-5 細胞を用いた HIV-1 ウイルスのクローニング方法の説明。MAGIC-5 細胞に段階希釈したウイルスを感染させ Agarose を重曹し、2~3 日後に X-gal を添加してさらに培養すると感染した多核巨細胞が青く染まり、実体顕微鏡下で確認して Pick up しウイルスを Cloning する。

図 2) クローン化したウイルスを CD4/CCR5 発現 HeLa 細胞 (HeLa4.5) に感染させ、そのゲノムを鋳型に 5'-LTR から Primer Binding Site (PBS) までの Short PCR と PBS から 3'-LTR の Long PCR で HIV-1 ゲノム全長に亘る Fragment を増幅する。さまざまな Primer の組み合わせから、特異的に増幅する Pair を選定する。

図 3) Short PCR と Long PCR 産物の Agarose 泳動像。HIV-1 subtype C の 93IN101 と GT3, および subtype E の NH1.1 と NH2.5 において ~9 Kbp におよぶ Amplicon が Extra band がほとんどない状態で、特異的に増幅される。

図 4) クローニングした HIV-1 subtype C 93IN101.1 の感染性クローン樹立過程における、HeLa4.5/LTR-nEGFP 細胞に各々のクローンを Transfect した後の感染性ウイルス産生にいたる再構築過程を示した。最初に構築した p93IN.101 は Tat を発現し、Transfect した個々の細胞の核は蛍光を発現しているが、Syncytium 形成は認められない。次に異なる Primer pair で構築した p93IN.def は蛍光を発現している多数の核からなる Syncytium 形成は認めるが、その上澄中には p24 gag が陽性であるにもかかわらず、感染性ウイルスの産生には至らなかった。なおこの上澄中にはウイルス粒子の形成が電子顕微鏡観察で認められた。この p93IN.def は蛍光を発現していることから、tat は発現し、Syncytium 形成陽性であることから少なくとも rev と env 遺伝子は機能していると考えられた。そこで同じ鋳型から 5LTR から vpr まで HIV-1 ゲノム左半分を増幅し、種々の制限酵素にて p93IN.def と共に切断後同じ切断片が生じるものをスクリーニングして選定した Nco I による切断片で再構築したのが pIndle-C1 である。このクローンの Transfect により上澄中に感染性ウイルスが認められた。

図 5) Transfect 後上澄中のウイルスの Coreceptor usage を MAGI および MAGIC-5 細胞株への感染性で調べたところ、親ウイルスと同様に CCR5 を用いる R5 の Phenotype を示していた。

図 6) これまでの HIV-1 感染性クローン樹立過程の Flowchart を示している。まず MAGIC-5 細胞株によるウイルスクローニングを行い、標的ウイルスを均一にする。次にこのウイルスを MAGIC-5 細胞にて増殖させ、LTR- $\beta$ Gal を組み込まない CD4/CCR5 発現 HeLa 細胞株 HeLa4.5 に感染させ、ゲノムを調整し、PCR の鋳型とする。5'-LTR から PBS までの Short PCR と PBS から 3'-LTR までの Long PCR をおこない、増幅された Amplicon を精製し、Short PCR Amplicon を pBR322 を骨格にして作成した Vector に組み込み、PBS 領域に多くの HIV-1 で保存されている Nar I と Rare Cutter である Not I で Long PCR Amplicon を処理した後、先の Vector に組み込み感染性クローンを構築する。作成したクローンを HeLa4.5/LTR-nEGFP に Transfect してその感染性等を Monitoring する。この戦略によりこれまでの感染性クローン構築の標準的な方法であった Phage Library からの Cloning 操作に比較して、より効率的に感染性のあるクローンの樹立の確立が高まるものと考えられた。

## Blue Plaque Cloning Procedure of HIV

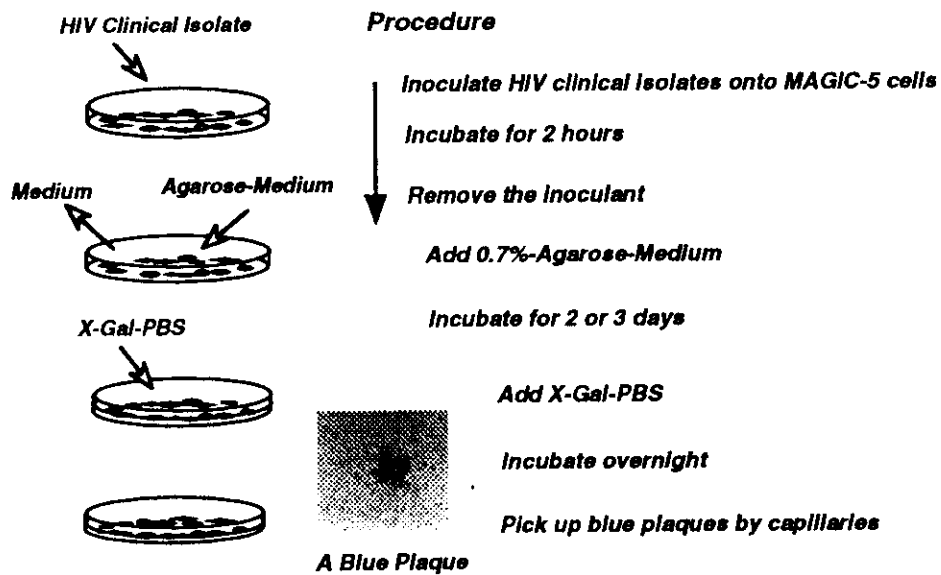


図1) MAGIC-5細胞を用いた Blue Plaque Assay によるウイルスクローニング

## Long Range PCR Amplification from Cloned HIV Provirus

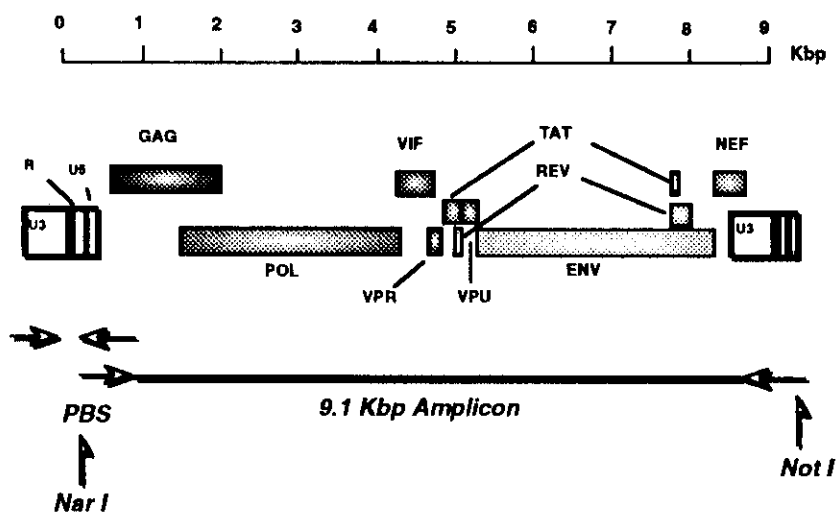


図2) Short および Long PCR で用いた Primer の位置

## Long Range PCR Amplification from Cloned HIV Provirus

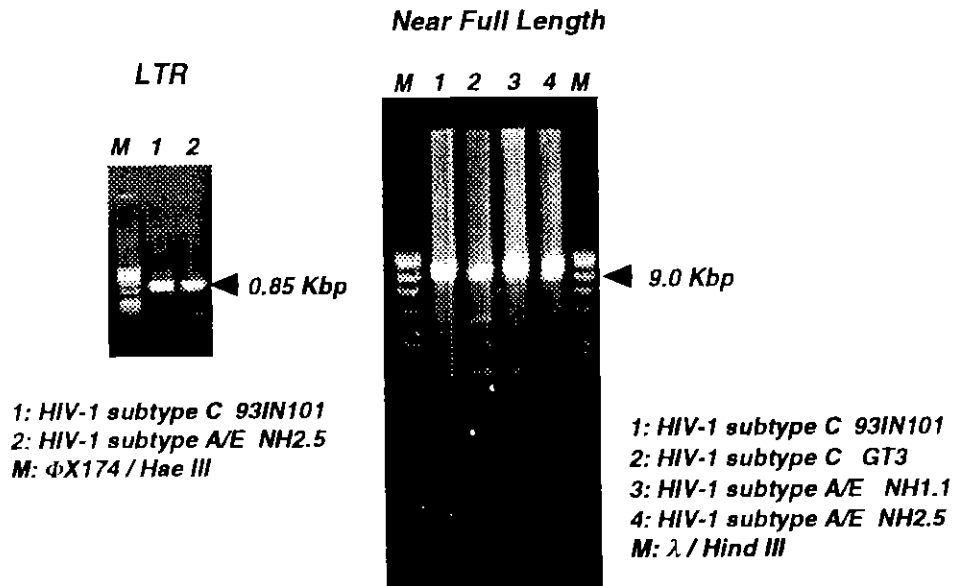


図3) Short PCR と Long PCR 産物の Agarose 電気泳動像

## Characterization of HIV-1 subtype C Molecular clones

Target Cells : HeLa 4.5. nEGFP

Transfected with	p 93IN.101	p 93IN.def	p Indie - C1
Tat	+	+	+
Fusion	-	+	+
p24 gag	-	+	+
Infectivity	-	-	+

図4) HIV-1 subtype C 93IN101 の感染性クローン樹立過程における再構築過程

**Infectious Virus Titer of Culture Supernatants  
after Transfection on 293T Cells**

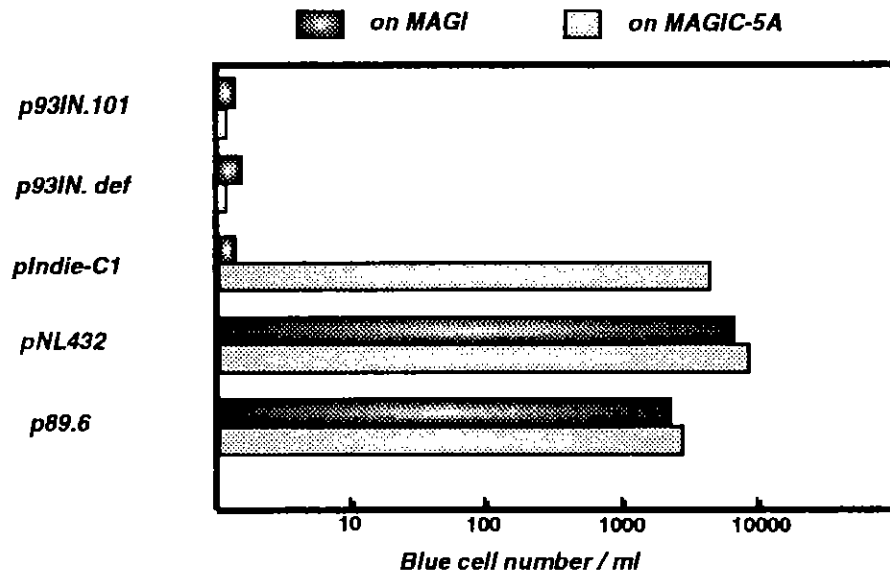


図5) 感染性クローン pIndie-C1 Transfection 後上澄中ウイルスの Coreceptor Usage

**Strategy for Infectious Molecular Clone of HIV-1**

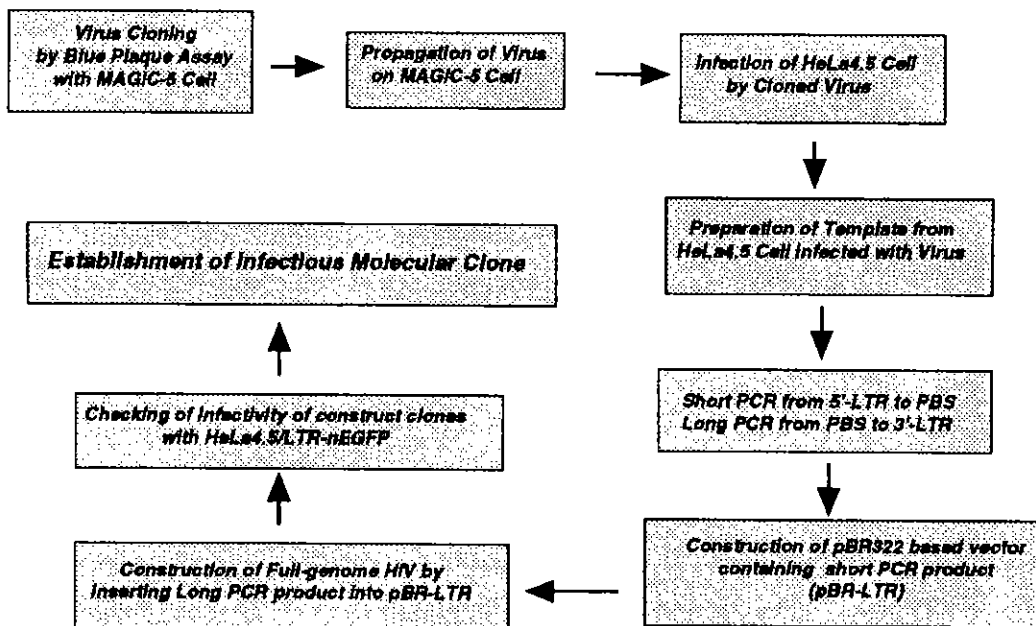


図6) HIV-1 感染性クローン樹立過程の Flowchart

## 日本のHIV-1の遺伝子・分子生物学的解析（集団的解析）

分担研究者 仲宗根正 国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官

研究要旨：日本に蔓延しているHIV-1に適したワクチン開発への基礎データ蓄積を最終目的とし、日本のHIV-1について遺伝子学的・分子生物学的特徴を経年的に明らかにすることを目的とし、今年度は以下の研究成果を得た。

- 1) V3領域について、1988-1993年(n=144)と1996-1998年のJCS(n=70)を比較するとアミノ酸が1個違っていた。
- 2) Subtype Aが1症例、Dが1症例、Eが5症例、Fが1症例確認され、日本に蔓延しているHIV-1はモザイク型の集団になりつつあることが判明した。
- 3) 日本に蔓延しているSubtype BのHIV-1については、集団的に見て遺伝子学的均一性はほぼ保たれていると言える。
- 4) 1998-1999年のウイルス分離率の推移を見ると、1992年前後と1997年前後の2個所に転換点が確認できた。これは、AZTの普及時期とカクテル療法の開始時期にそれぞれ一致しており、治療効果をウイルス生物学的に証明するデータである可能性が示唆された。

### A. 研究目的

日本に蔓延しているHIV-1に適したワクチン開発への基礎データ蓄積を最終目的とし、日本のHIV-1について遺伝子学的・分子生物学的特徴を経年的に明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

以下の項目について年単位で追跡調査する。

(1) V3領域におけるJapanese Consensus Sequence (JCS)のGenotypeとPhenotypeの推移

感染者末梢血単核球よりDNAを抽出し、PCR法によりV3領域を増幅後、ダイレクトシーケンス反応を行い、自動シーケンサーにより塩基配列を決定した。1996-98年のサンプルから70個のシーケンスを決定し、さらにJCSを決定した。

(2) V3領域における日本伝播HIVの遺伝子学的均一性の推移

得られた70個のシーケンスについて、V3各位のアミノ酸の出現頻度を算出した。さらに相同性を数値化しヒストグラムを描いた。このアミノ酸出現頻度と相同性ヒストグラムについて、1988-93年のものと比較検討した。

(3) ウイルス分離により得られるJCS臨床株の中和抗体による中和性の推移

1988年に分離された34臨床株について、JCSに一致する株を探し、同株の中和抗体による中和性を、1988-93年JCS株の中和性と比較する。

(4) ウイルス分離率の推移

1988年より継続中である、日本のHIV-1感染者からのウイルス分離率の推移を成分別（細胞成分と血漿成分）分離率も含めて解析した。1998年は、287サンプルからウイルス分離を行った。

### C. 研究結果

(1) V3領域におけるJapanese Consensus Sequence (JCS)のGenotypeとPhenotypeの推移

V3領域について、1988-1993年(n=144)と1996-1998年のJCS(n=70)を比較するとアミノ酸が1個違っていた（図1）。JCSはサブタイプBのGenotypeであった。

(2) V3領域における日本伝播HIVの遺伝子学的均一性の推移

V3領域の各位におけるアミノ酸出現頻度を過去の解析例（1988-93年、n=117）と至近3年間の解析例（1996-98年、n=69）で比較した（図1）。



GPGRを含む近傍でdiversityの増強がややみられが、その他の領域ではdiversityに変化はあまりみられなかった。C2-V3領域での系統樹解析 (図2) より、非サブタイプB症例が確認された。内訳は、サブタイプA: 1症例 (2サンプル)、サブタイプD: 1症例 (今回の図には含まれていない)、サブタイプE: 5症例、サブタイプF: 1症例であった。相同性ヒストグラムを過去の解析例 (1988-93年, n=117) と至近3年間の解析例 (1996-98年, n=62) で比較した (図3)。いずれも非サブタイプBを除いて比較した。1996-98年のピークが相同性が低い方 (多様性の拡散) へ若干偏移するも、著明な偏移とは言えないと考えられた。

(3) ウイルス分離により得られるJCS臨床株の中和抗体による中和性の推移

1996-1998年に159の臨床株が分離され、この中からJCSを有する株を選択中である。

(4) ウイルス分離率の推移 (図4)

1998-1999年のウイルス分離率の推移を見ると、1992年前後と1997年前後の2個所に転換点を確認でき、いずれのポイントでも減少の方向へ向かっていた。本研究において、1988-91年にAZTで治療を受けていたのは、HIV-1感染者の16.5%に過ぎない。1992-95年になって、AZT単剤あるいは2剤による治療がやっと標準 (69.0%) となり、プロテアーゼ阻害剤が使われ始めたのは1996年 (4.5%) になってからである。以後は、逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤の併用療法が主流となっている。このように、ウイルス分離率転時期は、AZTの普及時期とカクテル療法の開始時期にそれぞれ一致していた。分離陽性検体について成分別分離率をみると、血漿成分からの分離率が著しく減少しているのが確認できた。

#### D. 考察

日本に蔓延しているSubtype BのHIV-1に限って言えば、集団的に見て遺伝子学的多様性はさほど拡散しているとは言えず、均一性はほぼ保たれていると言える。しかしながら他Subtypeの流入およびその数の増加により、全体的に見ると均一ではなくなってきており、モザイク型の集団になりつつあることが判明した。このことは、同一サブタイプの感染を確実に抑える単一ワクチンの存在により、均一な集団内では感染の蔓延を効果的に防

御する反面、他サブタイプの新たな流入・蔓延に対しては無防備であることを示唆している。

治療中のHIV-1感染者の30-40%に遺伝子学的薬剤耐性株が出現していることが報告されている。しかしながら、今回の研究でウイルス分離率がいまだ減少傾向を示すことから、生物学的薬剤耐性株の頻度は遺伝子学的薬剤耐性株に比べて低い可能性、あるいは生物学的薬剤耐性株は増殖力が低いためにウイルス分離率に反映されない可能性などが示唆された。おそらく両者の出現時期にいくらかのタイムラグがあることが予想され、今後のウイルス分離率の推移を見守る必要がある。

#### E. 結論

1) V3領域について、1988-1993年 (n=144) と1996-1998年のJCS (n=70) を比較するとアミノ酸が1個違っていた。

2) Subtype Aが1症例、Dが1症例、Eが5症例、Fが1症例確認され、日本に蔓延しているHIV-1はモザイク型の集団になりつつあることが判明した。

3) 日本に蔓延しているSubtype BのHIV-1については、集団的に見て遺伝子学的均一性はほぼ保たれていると言える。

4) 1998-1999年のウイルス分離率の推移を見ると、1992年前後と1997年前後の2個所に転換点を確認できた。これは、AZTの普及時期とカクテル療法の開始時期にそれぞれ一致しており、治療効果をウイルス生物学的に証明するデータである可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) E. van der Ryst, T. Nakasone, E. Gormard, A. Venet, M. Girard and A. Borman. Immunogenicity of recombinant Mengoviruses expressing HIV-1 nef or SIV pol, gag and nef CTL epitopes. Res. in Virology. 149; 5-20, 1998.

2) Yoshino N, Naganawa S, Nakasone T, Imura S, National Cooperative Study Investigators on Vertical Transmission of HIV-1, Kita T, and Honda M. Vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in Japan, 1989-1997: presence of two subtypes B and E with subtype E predominance. Acta Paediatrica Japonica 40;503-509, 1998.

3) Nakasone T., Totani R., Yamazaki S. and Honda M. HIV-1 subtype A in Japan. AIDS 12;

950-952, 1998.

4) Nakasone T., Someya K., Ami Y., Ando S., Shinohara K., Yamamoto H., Yoshino N., Asano T., Lu Y., Matsuo K., Yamazaki S. and Honda M. A recombinant BCG vaccine for HIV-1 protects cynomolgus monkeys from SHIVMN challenge. Monduzzi Editore, 12th World AIDS Conference 1. Basic Science, pp87-90, 1998.

5) Yasuda Y., Iwasaki M., Oka S., Naganawa S., Nakasone T., Honda M., Kojima A., Matsuda S., Takemori T., and Tsunetsugu-Yokota Y. Detection of HIV-gag p24-specific antibodies in sera and saliva of HIV-a-infected adults and in sera of infants born to HIV-1-infected mothers. Microbiol. Immunol., 42;305-311, 1998.

6) Shinohara K., Sakai K., Ando S., Ami Y., Yoshino N., Takahashi E., Someya K., Suzaki Y., Nakasone T., Sasaki Y., Kaizu M., Lu Y., and Honda M. A highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus with genetic changes in cynomolgus monkey. J. Gen. Virol. in press, 1999.

## 2. 学会発表

1) Nakasone T., Someya K., Ami Y., Ando S., Shinohara K., Yamamoto H., Yoshino N., Asano T., Lu Y., Matsuo K., Yamazaki S. and Honda M. A recombinant BCG vaccine for HIV-1 protects cynomolgus monkeys from SHIVMN challenge. 12th World AIDS Conference (1998.7. Geneva)

2) Shinohara K., Sakai K., Takahashi E., Nakasone T., Ami Y., Ando S., Someya K., Yoshino N., Sasaki Y., Suzaki Y., Lu Y., Yamazaki S. and Honda M. A new pathogenic SHIV-cynomolgus monkey model for evaluation of HIV vaccine candidates. 12th World AIDS Conference (1998.7. Geneva)

3) Honda M., Nakasone T., Yoshino N., Kaizu M., Ami Y., Shinohara K., Takizawa M., Matsuo K., Someya K., Yamamoto H., Sasaki Y., Sakai K., Andou S., Takahashi E., Naganawa S., Hamano T., Kawahara M., Osu T., Hara T., Horibata S., Nagai Y., and Yamazaki S. Study of HIV/AIDS candidate vaccine to obtain good protective immunity. France-Japan AIDS Conference (1998.12.4-5 Tokyo)

4) 戸谷良造、三輪是、後藤濬二、唐沢哲郎、片平智行、内田雄治、柴田金光、六鹿正文、小崎

均、都築知代、金田弘次、仲宗根正、吉野直人、本多三男 本邦初例のHIV-1 subtype Aの報告 第102回東海産科婦人科学会(1998.03.08.岐阜)

5) 仲宗根正、Neal Y. Touzjian, Amie Strong, 山崎修道、本多三男、Yichen Lu Subtype E-SHIV/サル感染モデル開発の試み 第12回日本エイズ学会(1998.12/1-2.東京)

6) 吉野直人、仲宗根正、安藤秀二、長縄聡、岡本ゆかり、滝沢万里、原敬志、海津雅彦、浜野隆一、井村総一、大久保秀夫、大場悟、鈴木三郎、須藤寛人、高野政志、高山直秀、塚原優己、土江秀明、戸谷良造、早川智、保田仁介、南谷幹夫、喜多恒和、田代文夫、本多三男 日本における母子感染一過去10年間の感染研での解析一 第12回日本エイズ学会(1998.12/1-2.東京)

7) 喜多恒和、高野政志、戸谷良造、大久保秀夫、吉野直人、仲宗根正、本多三男、木原正博 本邦におけるHIV-1母子感染に関する疫学的、臨床的、免疫学研究 第12回日本エイズ学会(1998.12/1-2.東京)

8) 戸谷良造、内海眞、山中克郎、喜多恒和、高野政志、大久保秀夫、吉野直人、仲宗根正、本多三男 分娩周辺期の児への母体血曝露減少を重視したHIV母子垂直感染防止策 第12回日本エイズ学会(1998.12/1-2.東京)

9) 吉野直人、仲宗根正、安藤秀二、長縄聡、岡本ゆかり、滝沢万里、原敬志、海津雅彦、浜野隆一、井村総一、大久保秀夫、大場悟、鈴木三郎、須藤寛人、高野政志、高山直秀、塚原優己、土江秀明、戸谷良造、早川智、保田仁介、南谷幹夫、喜多恒和、田代文夫、山崎修道、本多三男 本邦におけるHIV-1母子感染 第11回日本性感染症学会(1998.12.5.東京)

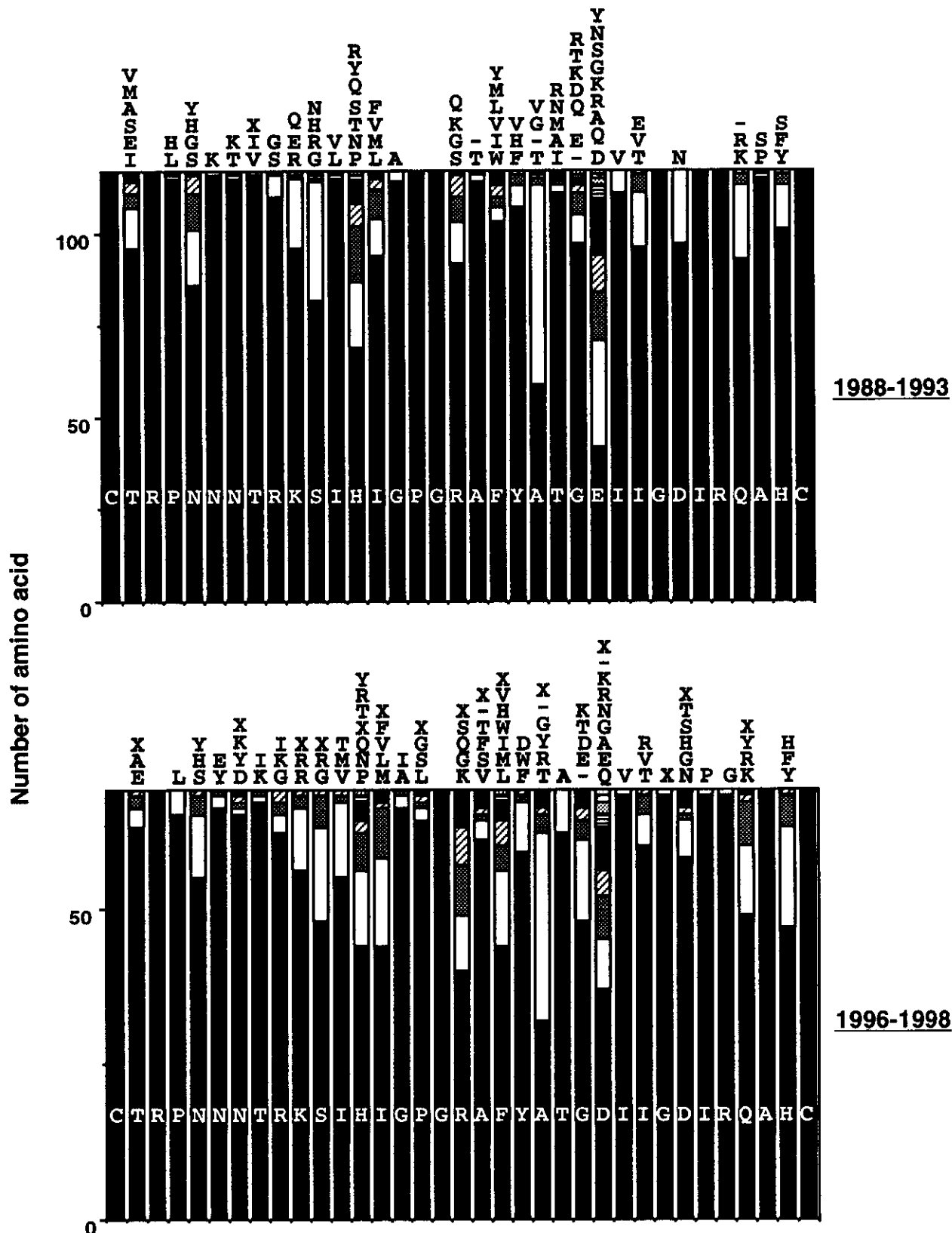


図 1. V3領域各位のアミノ酸出現頻度の推移  
 1988-93年と1996-98年の比較

図 2. V3領域の系統樹解析 (NJ法)

